

Figura 7. Cariotipo de *Sarasinula linguaeformis* en base a los 17 bivalentes en paquitene, alineados por los cinetocoros y agrupados según el tamaño y el índice de brazos. Se identifican 4 bivalentes en la región medial (1, 6, 7 y 12), 4 en la submedial (8, 9, 13 y 14), 5 en la subterminal (2, 3, 10, 11 y 15) y 4 en la terminal (4, 5, 16 y 17). Las flechas indican la presencia de knobs o nudos en los bivalentes 1, 6 y 12.

Figure 7. *Sarasinula linguaeformis* karyotype, obtained from the seventeen pachytene bivalents, lined in their kynetochores and grouped according to size and "arm" index. Four bivalents in the medial region are identified (1, 6, 7 and 12), 4 in the submedial (8, 9, 13 and 14), 5 in the subterminal (2, 3, 10, 11 and 15) and 4 in the terminal region (4, 5, 16 and 17). Arrows show the presence of knobs in bivalents 1, 6 and 12.

gonadales, representa un hecho nuevo en el estudio cromosómico en *Gastropoda*, hasta donde la información bibliográfica lograda lo permite aseverar.

La asociación de uno de los bivalentes al nucleolo, analizada en el presente trabajo, fue también citada por varios investigadores (SCHULTZ Y ST. LAWRENCE, 1949; FERGUSON-SMITH, 1964; entre otros) para espermatoцитos humanos.

De lo expuesto se desprende que los resultados abordados en la elaboración de cariotipos de bivalentes en paquitene, implica una clasificación ordenada en grupos y no una identificación indivi-

dual absoluta de los bivalentes. Este hecho revela semejanzas con las conclusiones obtenidas por HUNGERFORD (1971), FERGUSON-SMITH (1972) y LUCIANI, CAPODANO-VAGNER Y DE VICTOR-VUILLET (1972).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. J. W. Thomé la identificación de la especie estudiada y al Ing. Pablo Brainovich su colaboración en la transcripción con procesador de textos en computadora.

BIBLIOGRAFÍA

- ALDERETE DE MAJO, A. M., 1988. *Estudios citológicos en oligoquetos terrícolas de la provincia de Tucumán*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán, vii + 217 pp.
- BURCH, J. B., 1960. Chromosome studies of aquatic Pulmonate snails. *The Nucleus*, 3 (2): 177-208.
- BURCH, J. B., 1962. Citotaxonomic studies of freshwater limpets (Gasteropoda: Basommatophora). I- The european lake limpet, *Acroloxus lacustris*. *Malacologia*, 1 (1): 55-72.
- CARR, D. H. Y WALKER, J. E., 1961. Carbol fuchsin as a stain for mammalian chromosomes. *Stain Technology*, 36: 233-236.
- DULOUT, F. N. 1979. Técnicas modernas de citogenética molecular y su empleo en zoología. *Acta zoológica Lilloana*, 34: 27-37.
- FERGUSON-SMITH, M. A., 1964. The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes. *Cytogenetics*, 2: 124-134.
- FERGUSON-SMITH, M. A., 1972. Human chromosomes in meiosis. En de Grouchy, J., Eblin, F. J. G. y Henderson, I. W. (Eds.): *Human Genetics, Proceedings of the Fourth International Congress in Human Genetics*: 195-211. Excerpta Medica, Amsterdam and London.
- HUNGERFORD, D. A., 1971. Chromosome structure and function in man. I. Pachytene mapping in the male, improved methods and general discussion of initial results. *Cytogenetics*, 10: 23-32.
- INABA, A., 1953. Cytological studies in mollusks. I. Chromosomes in basommatophoric Pulmonata. *Journal of Science of the Hiroshima University, Series B, Division 1 (Zoology)*, 14 (16): 221-228.
- LEVAN, A., FREDGA, K. Y SANBERG, A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- LUCIANI, J. M., CAPODANO-VAGNER, A. M. Y DE VICTOR-VUILLET, M., 1972. Techniques d'analyse de la méiose chez l'humme. *Monographies Annales de la Societé Francaise de Biologie Clinique, Biologie génétique*: 41-53.
- NATARAJAN, R. Y BURCH, J. B., 1966. Chromosome of some Archaeopulmonata (Mollusca: Basommatophora). *Cytologia*, 31 (2): 109-116.
- PATTERSON, C. M., 1969. Chromosomes of Molluscs. *Marine Biological Association of India, Proceedings Symposium 2/Molluscs*: 635-686.
- PATTERSON, C. M. Y BURCH, J. B., 1978. Chromosome of pulmonate molluscs. En Fretter, V. y Peake, J. (Eds.): *Pulmonates: Vol. 2A: Systematics, Evolution and Ecology*: 171-217. Academic Press, London, New York, San Francisco.
- RAINER, M., 1967. Chromosomenuntersuchungen an Gasteropoden (Stylommatophora). *Malacologia*, 5 (3): 341-370.
- RIVA, R. R. Y VIDAL, O. R., 1973. Nota sobre cromosomas de la babosa *Vaginula solea* d'Orbigny. *Physis, Sección C (Buenos Aires)*, 32 (85): 237-239.
- SCHULTZ, J. Y ST. LAWRENCE, P., 1949. A cytological basis for a map of the nucleolar chromosome in man. *Journal of Heredity*, 40: 31-38.
- THOMÉ, J. W., 1975. Estado atual da sistemática dos Veronicellidos americanos (Mollusca, Gasteropoda). *Arquivos do Museu Nacional Rio de Janeiro*, 55: 155-165.

Recibido el 9-III-1993
Aceptado el 20-XI-1993

Espermatogénesis en *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Gastropoda, Veronicellidae)

Spermatogenesis in *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Gastropoda, Veronicellidae)

Ana María ALDERETE DE MAJO, Eugenia María USANDIVARAS
y Ana Claudia MERCADO LACZKO*

RESUMEN

Se realizó el estudio de la gametogénesis masculina en 58 ejemplares de *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885), recolectados en San Miguel de Tucumán, Argentina, mediante técnicas eminentemente citológicas y citogenéticas, y el empleo de la técnica de "air-drying" modificada para oligoquetos terrícolas y puesta a punto para gasterópodos terrestres en la presente investigación.

Los resultados obtenidos permiten concluir que este proceso se lleva a cabo a través de cinco divisiones mitóticas, no siempre sincrónicas, desde espermatogonias (células aisladas o agrupadas en número de 2, 4, 8 y 16, unidas por puentes citoplasmáticos) hasta espermatocitos primarios (conglomerados de aproximadamente 32 elementos celulares, alrededor de una masa citoplasmática o citóforo) y de la meiosis, que conduce a la formación de espermatocitos secundarios (células agrupadas en número de 64, número este variable por asincronía en el desarrollo de las divisiones celulares, inmersas en un citóforo destacable) y de espermatidas (conglomerados de alrededor de 128 elementos celulares, con el máximo desarrollo del citóforo), que se transforman en espermatozoides. Estos últimos han perdido todos los puentes citoplasmáticos.

ABSTRACT

The spermatogenesis of *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Gastropoda, Veronicellidae) was studied in fifty eight specimens, collected in San Miguel de Tucumán, Argentina, using a previously modified air-drying technique for terrestrial Oligochaeta especially adapted for terrestrial Gastropoda.

It was determined that the male cells undergo five mitotic divisions, not always synchronous, from spermatogonia (isolated or clustered cells of 2, 4, 8, 16 elements, linked by cytoplasmic bridges) to spermatocytes I (groups of approximately 32 elements, arranged around the cytophore), and the meiotic division which originate spermatocytes II (groups of about 64 cells, because of the frequent asynchronous cell divisions embedded in the cytophore); spermatids (groups of approximately 128 elements around the major cytophore) which become spermatozoa.

PALABRAS CLAVE: Gastropoda, Veronicellidae, *Sarasinula linguaeformis*, espermatogénesis.

KEY WORDS: Gastropoda, Veronicellidae, *Sarasinula linguaeformis*, spermatogenesis.

* Cátedra de Invertebrados. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205. (4000) San Miguel de Tucumán. República Argentina.

INTRODUCCIÓN

La gametogénesis en los Moluscos ha sido estudiada por numerosos autores. En lo que se refiere a los Soleolifera, orden que incluye a las familias Onchidiidae, Veronicellidae y Rathonsiidae (THOMÉ, 1975), este proceso fue analizado en Onchidiidae, concretamente en *Onchidella celtica*, por TUZET (1940) para la espermatogénesis y por GABE (1951), en lo que acontece a la ovogénesis, y en los Veronicellidae por HOFFMANN (1925) y QUATRINI Y LANZA (1964a, b, c; 1965a, b). Los últimos realizaron el análisis de la estructura de la gónada y los procesos de espermatogénesis y ovogénesis en *Vaginulus borellianus* (Colosi) y en *Laevicaulis alte* (Férussac). Estas investigaciones fueron llevadas a cabo tanto a nivel óptico como electrónico. Los estudios basados en microscopía óptica han sido hechos fundamentalmente sobre material obtenido por cortes histológicos de la gónada o por aplastamiento de dicho órgano.

En cuanto a la gametogénesis de *Sarasinula linguaeformis* no existe antecedente alguno. Es por ello que se ha abordado su estudio, en base a técnicas eminentemente citogenéticas, y que se describen en el apartado correspondiente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Especie estudiada: *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (ver ALDERETE DE MAJO, 1996).

Datos de recogida: los 58 ejemplares empleados fueron recolectados en la localidad de San Miguel de Tucumán, Argentina, durante los años 1990 y 1991, incluyendo las cuatro estaciones.

Los ejemplares fueron procesados individualmente según los pasos detallados en ALDERETE DE MAJO (1996).

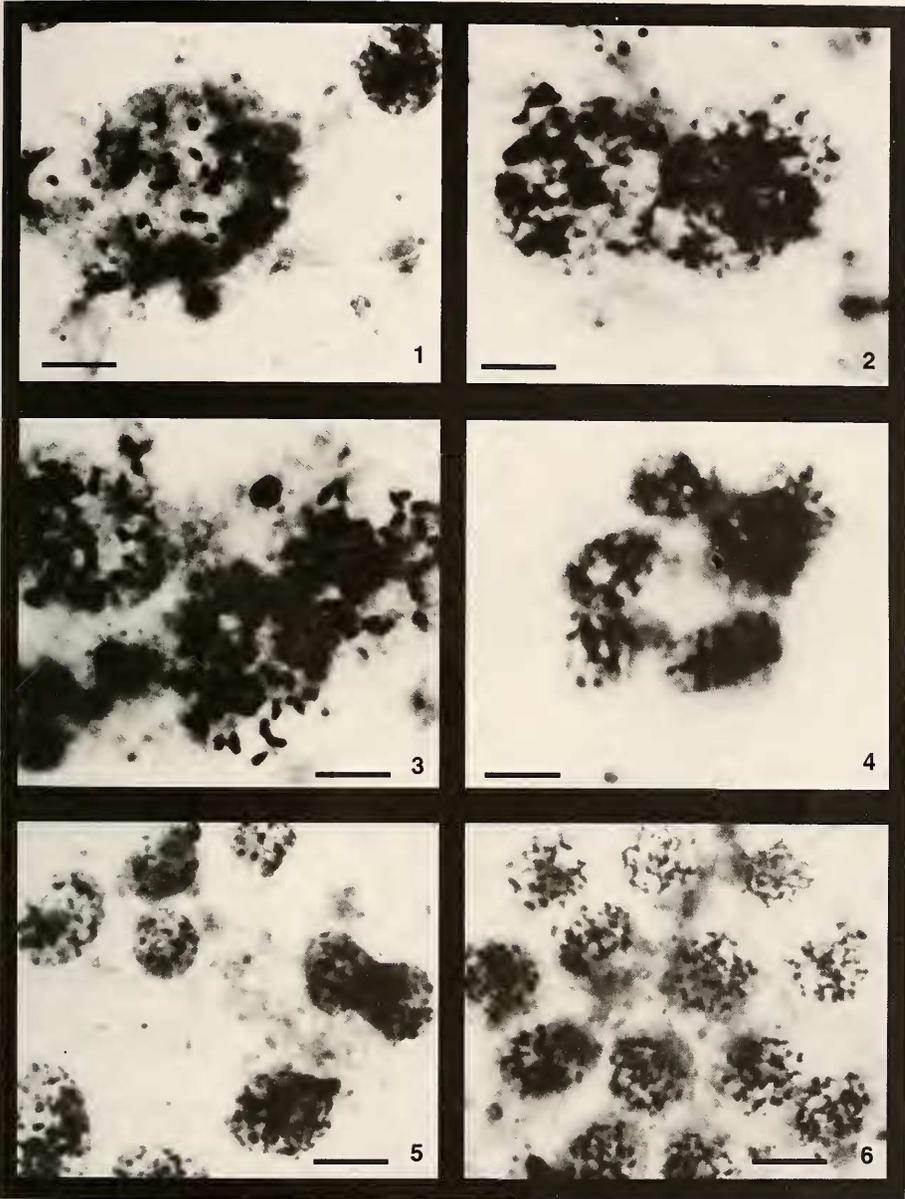
RESULTADOS

Los resultados obtenidos permiten concluir que el proceso de espermatogénesis se lleva a cabo a través de cinco

divisiones mitóticas, no siempre sincrónicas, desde espermatogonias aisladas y agrupadas (2, 4, 8 y 16, unidas por puentes citoplasmáticos), hasta espermatocitos I (conglomerados de 32 elementos celulares, alrededor de una masa citoplasmática o citóforo) y de la división meiótica, que conduce a la formación de espermatocitos II (agrupaciones celulares en número de 64, inmersas en un citóforo destacable) y de espermátidas (grupos de 128, alrededor de un citóforo en su máximo estado de desarrollo, con un volumen muy superior al observado en etapas precedentes), las cuales se transforman en espermatozoides. Cabe destacar que los números indicados para todas las agrupaciones antes citadas, varían frecuentemente por asincronía en el desarrollo de las divisiones celulares. Los espermatozoides han perdido todos los puentes citoplasmáticos y se presentan sin conexiones con otras células. Presentan un núcleo corto redondeado, ovalado o cónico y un largo flagelo, que mide alrededor de 350 μm (Figs. 1-12).

Por otra parte y en cuanto al análisis citoquímico del citóforo realizado por medio de la reacción de Feulgen, puede afirmarse que éste, ya sea tanto en el estado temprano de desarrollo como en el de máximo crecimiento, se presenta negativo ante esta reacción nuclear específica. En efecto, los conglomerados teñidos con esta técnica, mostraron sus núcleos sin elemento alguno que los una. Los resultados así obtenidos permiten inferir que el citóforo carece de material nuclear, y deducir en cambio que es de naturaleza citoplasmática (Figs. 13-15).

Los elementos celulares de la línea germinal masculina han sido observados en los disgregados junto a los de la femenina y se han diferenciado de los mismos debido a que los núcleos de las ovogonias presentan un tamaño considerablemente mayor que el de las espermatogonias y, además, porque las células que intervienen en el proceso de espermatogénesis se presentan formando conglomerados, y no así las de la línea germinal femenina.



Figuras 1-6. Espermatogénesis de *Sarasinula linguaeformis*. Tinción Giemsa. 1: espermatogonia aislada; metafase gonial. 2: espermatogonia en división. 3: espermatogonias agrupadas (2); una en división. 4: espermatogonias agrupadas (5). 5: espermatogonias agrupadas (8); una en división. 6: espermatogonias agrupadas (13); premetafases goniales. Escalas 5,3 μ m.

Figures 1-6. Spermatogenesis in Sarasinula linguaeformis. Giemsa staining. 1: isolated spermatogonia; gonial metaphase. 2: dividing spermatogonia. 3: grouped spermatogonia (2); one of them dividing. 4: grouped spermatogonia (5). 5: grouped spermatogonia (8); one of them dividing. 6: grouped spermatogonia (13); gonial premetaphases. Scale bars 5.3 μ m.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que la espermatogénesis de *Sarasinula linguaeformis* se lleva a cabo a través de cinco divisiones mitóticas y la meiosis. Si bien los tipos celulares observados coinciden, en términos generales, con los descritos mediante microscopía óptica (WATTS, 1952 y BURCH, 1960) y electrónica (QUATTRINI Y LANZA, 1965 b) en Gastropoda y en Mollusca (LUCAS, 1971), se detectaron hechos en la literatura sobre este tema que hacen necesaria su mención:

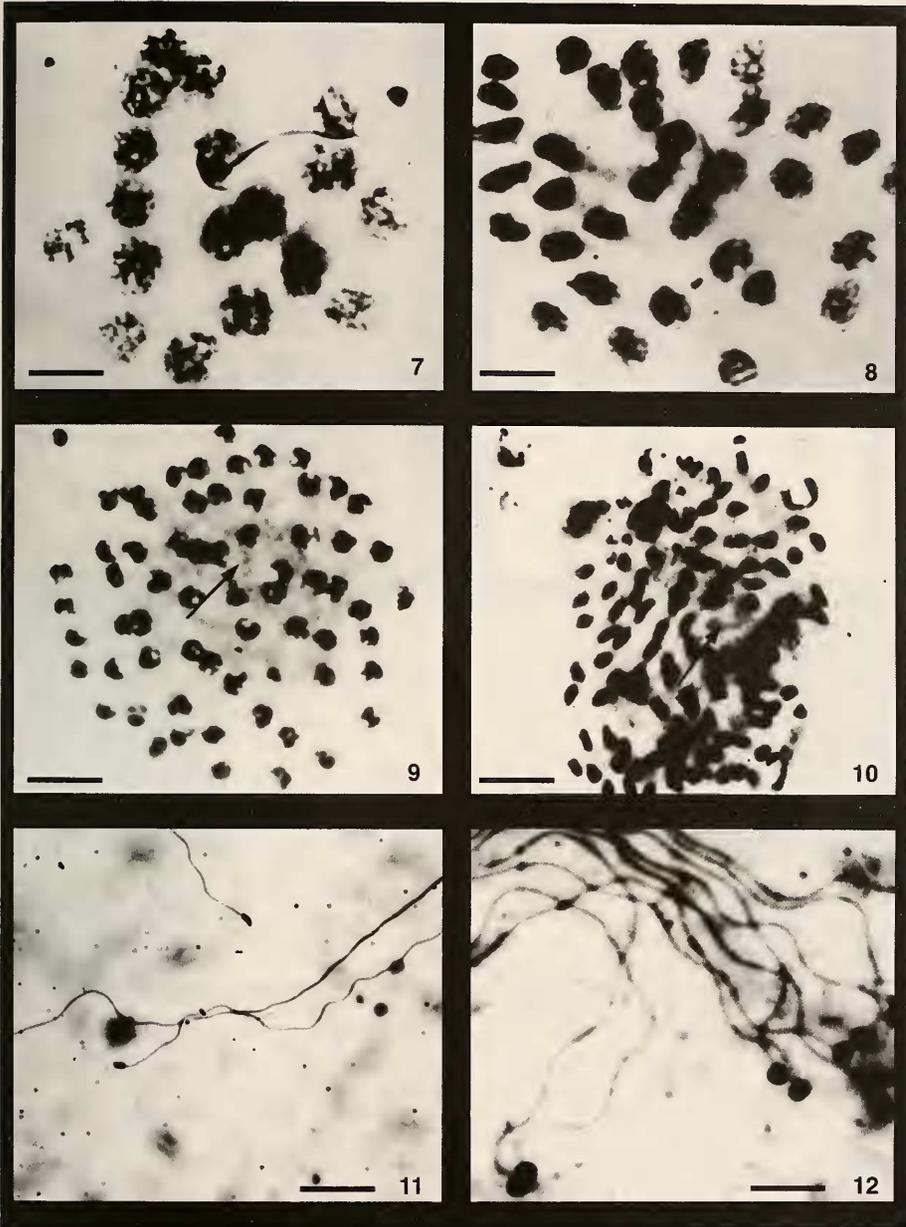
Espermatogonias: La presencia de espermatogonias aisladas ha sido citada por TUZET Y MARIAGGI (1951) y por SABELLI, SABELLI SCANABISSI Y MERLONI (1978), así como también el menor tamaño de sus núcleos, comparado con el de las ovogonias. En cuanto a las formas agrupadas, los resultados de esta investigación son sólo en parte coincidentes con los de otros autores. En efecto, en lo que a la frecuente asincronía de las divisiones celulares en un mismo conglomerado se refiere, no concuerda con lo descrito por BURCH (1960) para Pulmonata, quien afirmó que «todas las células de los conglomerados se encuentran en exactamente el mismo estado de división». Tampoco coincide con la sincronía de las divisiones celulares citada por SABELLI ET AL. (1978). Por otra parte, la presencia de puentes citoplasmáticos concuerda con lo manifestado por TUZET Y MARIAGGI (1951), quienes denominaron a dicha masa citoplasmática «citóforo», como había sucedido previamente para Lumbricidae (Oligochaeta) (CHATTON Y TUZET, 1941; 1942; 1943).

Espermatocitos I: La frecuente asincronía en el desarrollo de los ciclos celulares de los más o menos 32 núcleos agrupados y unidos por puentes citoplasmáticos, como así también la falta de adherencia o relación a célula nodriza alguna, difieren de lo explicado por WATTS (1952), BURCH (1960), QUATTRINI Y LANZA (1965 b) y SABELLI ET AL. (1978), quienes describieron el desarrollo de grupos isó-

genos y sincrónicos de espermatocitos I, alrededor de células nutricias («células de Sertoli») o bien de un citóforo nucleado y con contornos regulares, adquiriendo así el aspecto de una célula nutricia (TUZET Y MARIAGGI, 1951).

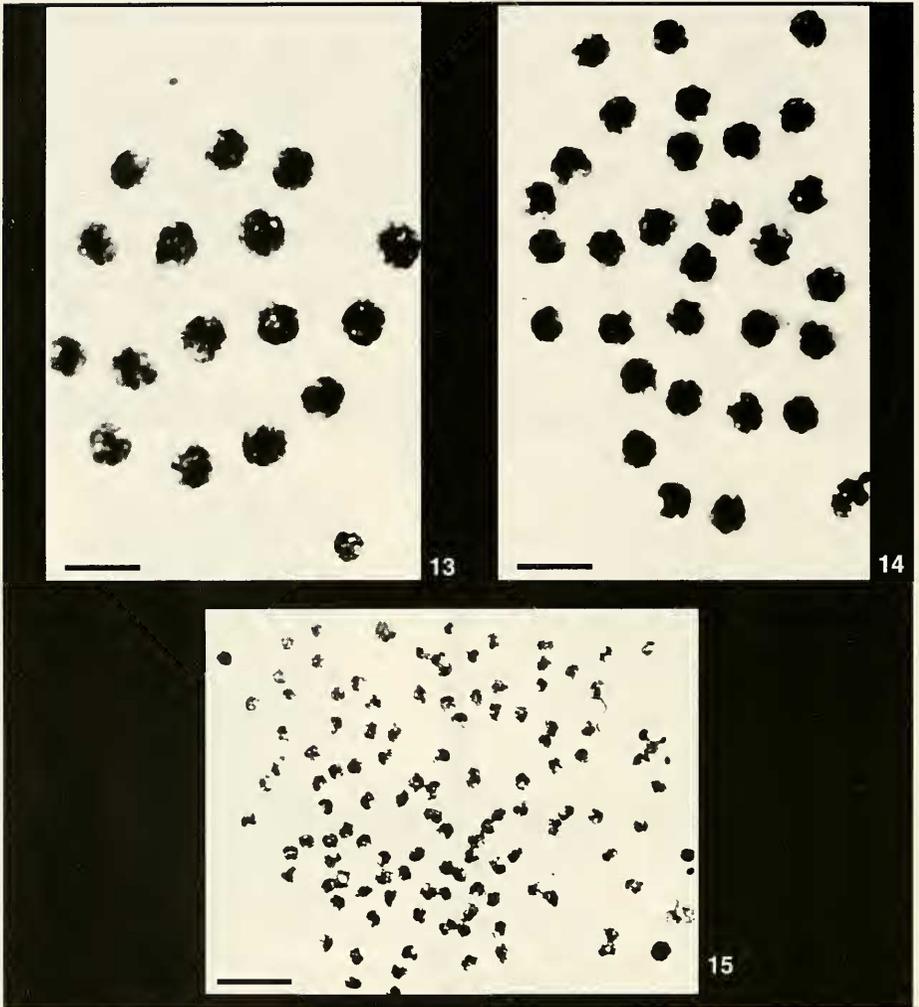
Espermatocitos II: La masa citoplasmática o citóforo, que alcanza un crecimiento destacable en esta etapa, fue descrita por varios autores (WATTS, 1952; BURCH, 1960 y SABELLI ET AL., 1978) como una gran célula nutricia, lo que representa una notable discrepancia con los hallazgos de esta investigación, como será explicado posteriormente.

Espermátidas: El hecho que merece una atención especial está referido fundamentalmente al citóforo, que en esta etapa alcanza el mayor desarrollo. La interpretación de éste como material citoplasmático y no como célula nodriza, como así también el no haber observado la adherencia de cada grupo de gonocitos en general y de espermátidas en particular a una única célula nutriente, no concuerda con las descripciones de WATTS (1952), AUBRY (1954), YASUZUMI, TANAKA, TEZUKA Y NAKANOS (1959), BURCH (1960), QUATTRINI Y LANZA (1965b), JOOSE, BOER Y CORNELISSE (1968) y SABELLI ET AL. (1978). Sin embargo, coincide con los hallazgos de FRANZEN (1970), quien se expresa de la siguiente manera: «el citoplasma no usado en la vaina plasmática, es eliminado y por ello se denomina citoplasma residual y parte de él fluye dentro del citóforo, que forma el centro del áster radial y de las espermátidas, durante una de las fases de la histogénesis. Es imposible observar ninguna célula especial nutriente en la masa citoplasmática, alrededor de la cual se agrupan las espermátidas». Asimismo y bajo un panorama taxonómico más amplio, el citóforo en los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis de Oligochaeta, fue estudiado por numerosos autores, tanto a nivel óptico como electrónico. En cuanto a ello, el análisis citológico de la estructura antes mencionada en tres especies del género *Pheretima* en base a la reacción de Feulgen, fue



Figuras 7-12. Espermatogénesis de *Sarasinula linguaeformis*. Tinción Giemsa. 7: espermatogonias agrupadas (16); dos en división. 8: espermatocitos I (32); tres en división. 9: espermatocitos II (64); citóforo (flecha). 10: espermátidas (128); citóforo (flecha). 11, 12: espermatozoides. Escalas, 7-10: 19,2 μm ; 11, 12: 5,3 μm .

Figures 7-12. Spermatogenesis in Sarasinula linguaeformis. Giemsa staining. 7: grouped spermatogonia (16); two of them dividing. 8: spermatocytes I (32); three dividing. 9: spermatocytes II (64); cytophore (arrow). 10: spermatids (128); cytophore (arrow). 11, 12: spermatozoa. Scale bars, 7-10: 19.2 μm ; 11, 12: 5.3 μm .



Figuras 13-15. Espermatogénesis de *Sarasinula linguaeformis*. Coloración Feulgen. 13: Espermatogonias agrupadas (16). Ausencia de puentes citoplasmáticos. 14: Espermatocitos II (64). Ausencia de citóforo. 15: Espermátidas (128). Ausencia de citóforo. Escalas 19,6 μ m.

Figures 13-15. Spermatogenesis in Sarasinula linguaeformis. Feulgen staining. 13: grouped spermatogonia (16). Note the absence of cytoplasmic linkages. 14: spermatocytes II (64). Absence of cytophore. 15: spermatids (128). Absence of cytophore. Scale bars 19.6 μ m.

negativo a esta reacción nuclear (ALDERETE DE MAJO, 1988). Estos resultados son coincidentes con los estudios realizados al respecto en otros Oligochaeta, a nivel de microscopía electrónica (MARTINUCCI Y FELLUGA, 1975; MARTINUCCI, FELLUGA Y CARLI, 1977; FUGE, 1976 y JAMIESON, 1981).

Espermatozoides: la morfología del espermatozoide de *Sarasinula linguaeformis* con una cabeza corta y redondeada o cónica y un largo flagelo, sería de tipo primitivo, considerando lo expuesto por TUZET (1950), quien fundamentó la morfología de los gametos masculinos en relaciones filogenéticas. Sin embargo, el